

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/10, C07K 7/06, 7/08, A61K 38/08, 38/10 // C12N 15/86	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/20572 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. April 2000 (13.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07296 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Oktober 1999 (01.10.99) (30) Prioritätsdaten: 198 45 434.1 2. Oktober 1998 (02.10.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHRADER, Jürgen [DE/DE]; Meliesallee 13, D-40597 Düsseldorf (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERRMANN, Andreas [DE/DE]; Löwenburgstrasse 26, D-50939 Köln (DE). (74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: TISSUE BINDING PEPTIDES, IDENTIFICATION, PRODUCTION AND UTILIZATION THEREOF (54) Bezeichnung: GEWEBEBINDENDE PEPTIDE, IHRE IDENTIFIZIERUNG, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG (57) Abstract <p>The present invention relates to tissue binding peptides having amino acid sequence GEGRTVVLSF, AWCRRGGILGDAM, GNLVDLVVGFDD, RVSPKKSGGGV, GSSKWGLTXKCG, RGGVRQSRGRR, GEGRTVVCRS or SQRWTALWQWIG and to variants of said peptides. The invention also relates to the identification of said peptides with the aid of tissues, to the production and utilization of said peptides as medicaments or diagnostic agents.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf gewebebindende Peptide mit der Aminosäuresequenz GEGRTVVLSF, AWCRRGGILGDAM, GNLVDLVVGFDD, RVSPKKSGGGV, GSSKWGLTXKCG, RGGVRQSRGRR, GEGRTVVCRS oder SQRWTALWQWIG sowie Varianten davon, ihre Identifizierung mit Hilfe von Geweben, ihre Herstellung und Verwendung als Arzneimittel oder Diagnostikum.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsehan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

5 **Gewebebindende Peptide, ihre Identifizierung, Herstellung und Verwendung**

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf gewebebindende Peptide, ihre Identifizierung mit Hilfe von Geweben, ihre Herstellung und Verwendung als
10 Arzneimittel oder Diagnostikum.

Die Pathogenese der Arteriosklerose wird zunehmend zunehmend auf eine Schädigung des Endothels, die in einer endothelialen Dysfunktion resultiert, zurückgeführt. Eine endotheliale Dysfunktion spiegelt sich vor allem in einem
15 veränderten Expressionsmuster von Oberflächenproteinen (Selektinen, Adhäsionsmoleküle) aber auch in veränderten Syntheseraten von Wachstumshormonen wieder. So führt z. B. im frühen Stadium der Arteriosklerose eine erhöhte Expression der E- und P-Selektine und der zellulären Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM zur Einwanderung von Monocyten in die
20 Gefäßwand. Die Umwandlung der Monocyten in Makrophagen führt zu einer veränderten Synthese von Wachstumsfaktoren, die insbesondere glatte Muskelzellen zur Proliferation und zur Freisetzung von Mediatoren, die inflammatorisch wirken, anregen.

25 Die medikamentöse Therapie der Arteriosklerose versucht die Ursachen frühzeitig, möglichst vor der Manifestation zu verringern. Ein Hauptziel ist dabei, durch eine Erhöhung der Ausscheidung der Cholesterinmetabolite (Gallensäuren) oder durch eine Verminderung der Cholesterinbiosynthese den erhöhten Plasmacholesterinspiegel zu reduzieren. Aufgrund der vom Organismus
30 eingeleiteten Gegenregulation läßt sich mit einer medikamentösen Therapie der Gesamtcholesterinspiegel nur um ca. 30% senken. Da dieses Verfahren außerdem nicht geeignet ist, eine Regression einer bestehenden Arteriosklerose zu induzieren, ist die perkutane, transluminale Angioplastie (PTA), d. h. die Aufweitung des stenosierten Gefäßabschnittes mittels eines Ballonkatheters, heutzutage die Therapie

der Wahl. Nachteil dieser Therapieform ist jedoch, daß es in 30-50% der behandelten Patienten zu einer Restenose, d. h. zu einem Wiederverschluß kommt. Alternativ erfolgt daher eine chirurgische Behandlung, indem ein Bypass gelegt wird. Aber auch bei dieser Therapie tritt bei ca. 50% der Patienten innerhalb von 3-
5 6 Monaten nach der Behandlung eine Restenosierung des Bypass-Gefäßes auf.

Es wurden daher eine Reihe von gentherapeutischen Verfahren entwickelt, bei denen ein zweiter Katheter verwendet wird, über den ein gentherapeutisch wirkender Vektor lokal an den betroffenen Gefäßabschnitt appliziert wird (siehe z.
10 B. WO95/27070).

Für die lokale Applikation des therapeutischen Gens wurden verschiedene Strategien auf der Basis von modifizierten Ballonkathetern entwickelt, die eine direkte Applikation einer Substanz bzw. des Gens in die Gefäßwand erlauben
15 sollen. Nach einer lokalen Applikation mit einem Doppelballonkatheter konnten z. B. Nabel, E. R. et al. (1990) Science 249, 1285 eine transiente Expression des β -Galactosidasogens in transfizierten Zellen der Femoralarterie des Schweines durch liposomale und retrovirale Transfektion nachweisen. Eine langandauernde Expression (bis zu 5 Monaten) konnten sie jedoch nur nach retroviraler
20 Transfektion erzielen, während eine Expression in liposomal transfizierten Zellen nur bis zu 4 Wochen nachweisbar war. Neben der Transfektionsdauer ist vor allem die geringe Transfektionseffizienz ein limitierender Faktor des liposomalen Transfers. Die Transfektionseffizienz konnte beispielsweise durch die Verwendung von HVJ-Liposomen gesteigert werden (Morishita, R. et al. (1994)
25 Gene 149, 13). In diesem System werden inaktivierte Sendaiviren (hemagglutinating virus of Japan, HVJ) mit DNA-haltigen Liposomen fusioniert. Aufgrund der viralen Fusions- und Bindeproteine (F- und HN-Protein) kann das genetische Material unter Umgehung der Lysosomen direkt ins Cytoplasma der Zelle effizient eingeschleust werden. Schließlich gibt es die Möglichkeit
30 zellspezifische Antikörper an liposomale (Vingerhoeds, H. et al. (1994) Immunmeth. 4, 259) oder virale (Wickham, T. J. et al. (1996) J. Virol. 70, 6831) Vektoren zu koppeln, um das unter der Kontrolle eines starken, viralen Promoters

stehende therapeutische Gen gezielt nur in den gewünschten Zelltyp einschleusen zu können.

5 Nachteil dieser Verfahren ist jedoch, daß zum einen ein zusätzlicher Eingriff notwendig ist und zum anderen die Effizienz des lokalen Gentransfers im Organismus im allgemeinen nicht sehr hoch ist. Schließlich werden mit einem Katheter nicht alle Gefäße erreicht, insbesondere nicht die kleinkalibrigen Arterien und Kapillaren. Dies ist insofern von Bedeutung, da arteriosklerotische Wandveränderungen nicht nur die großen Gefäße betreffen, sondern auch in
10 kleineren Arterien vorkommen.

Die Optimierung einer gewebespezifischen Expression ist insbesondere für die Therapie von vaskulären Erkrankungen von großer medizinischer Bedeutung. Dabei eröffnen sich nicht nur Möglichkeiten direkte Gefäßerkrankungen, wie z. B.
15 Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen (Stenose, Restenose, Herzinfarkt) zu therapieren, sondern auch alle über die Blutbahn zu erreichenden Organe sowie Tumore. Letztendlich kann über einen gewebegerichteten Gentransfer in vaskuläre Zellen auch die Expression von therapeutischen Proteinen erfolgen, die aufgrund pathologischer oder genetischer Veränderungen im Zielorganismus nicht oder nicht
20 mehr im ausreichenden Maße vorhanden sind, z. B. Faktor VIII-Mangel, Insulinmangel etc.

Ein wesentliches Ziel der somatischen Gentherapie ist es daher, ein therapeutisches Gen nach systemischer oder lokaler Administration so spezifisch wie möglich in die
25 Zielzellen des Organismus einzuschleusen und das therapeutische Gen im wesentlichen nur in diesen Zellen zu exprimieren. Hierzu sollte das therapeutische Gen einerseits so verpackt sein, daß es beim Transport durch das Blutgefäßsystem durch Nukleasen im wesentlichen nicht abgebaut wird, und andererseits sollte es in eine Form vorliegen, die eine zellspezifische Genexpression in den Zielzellen
30 ermöglicht. Das spezifische Erkennen von Zellen bezeichnet man auch als „Targeting“. Für dieses Targeting stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung: zum einen kann man Antikörper gegen Rezeptoren an der

Zelloberfläche verwenden, die in virale oder liposomale Vektorsysteme integriert sind (Vingerhoeds, H. et al (1994) supra; Wickham, T. J. (1996) supra), und zum anderen kann man Peptide mit hoher Bindungsaffinität für Rezeptoren auf der Zelloberfläche verwenden.

5

Mit bestimmten Antikörpern konnten beispielsweise bestimmte Tumorzellen erkannt und mittels einer geeigneten Markierung sogar im intakten Gewebeverband nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Nachteil von Antikörpern ist jedoch, daß sie aus technischen Gründen meist in der Maus hergestellt werden und an Patienten oft zu schwerwiegenden Nebenwirkungen aufgrund einer Immunreaktion führen. Selbst sogenannte humanisierte Antikörper sind nicht frei von diesem Problem. In Einzelfällen kann es zu solch ausgeprägten Immunkomplexen kommen, die die Durchblutung der Niere drastisch einschränken und so zu einer tödlich verlaufenden Niereninsuffizienz führen.

15

Mit peptidpräsentierenden Banken konnten beispielsweise Interaktionen von Proteinen mit anderen Makromolekülen wie Zuckern, Antikörper, Lipiden oder Proteinen in vitro studiert werden. Peptidpräsentierende Banken, die chemisch hergestellt werden, wurden z. B. von Geysen, H. M. et al. (1996) Mol. Immunol. 23, 709 oder de Koster, H. S. (1995) J. Immunol. Methods 187, 179-188 beschrieben. Bei der Peptidsynthese wurden an der Festphase Aminosäuregemische verwendet, so daß die Aminosäureabfolge der sich ergebenden Peptide statistisch, d. h. zufallsmäßig verteilt war. Die Peptidbanken konnten hierbei auch in Harzgebundener Form verwendet werden (de Koster, H. S. et al. (1995) supra).

25

Mit der Verwendung von peptidpräsentierenden Banken, die beispielsweise auf der Präsentation der Peptide auf der Oberfläche von Phagen beruhen, wurde es möglich, eine Vielzahl verschiedener Peptide (bis zu ca. 10^{11} Peptide) gleichzeitig zu präsentieren. Dabei werden die Peptide z. B. am N-Terminus des pIII Hüllproteins filamentöser Phagen präsentiert (siehe z. B. Kay, B. K. et al. (1993) Gene 128, 59 oder Jellis, C. L. et al. (1993) Gene 137, 63-68). Die Länge der präsentierten Peptide variierten von 6 bis 38 Aminosäuren. Die Phagenbanken

30

wurden unter anderem zum Epitopscreening von Antikörpern (Cortese, R. et al. (1994) Trends Biotechnol. 12, 262; Grihalde, N. D. et al. (1995) Gene 166, 187), zur Charakterisierung von protein- bzw. peptidbindenden Domänen (Adey, N. B. & Kay, B. K. (1996) Gene 169, 133; Blond-Elguindi, S. et al. (1993) Cell 75, 717-728; Balass, M. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10638-10642), zur Entdeckung von DNA-bindenden Motifen (Wang, B. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 23239), zur Identifizierung von unbekannten Rezeptoren, die z. B. an virale Bindungsproteine binden (Hong, S. S. & Boulanger, P. (1995) EMBO J. 14, 4714), zur Identifizierung von proteinbindenden Peptiden (Daniels, D. A. & Lane, D. P. (1994) J. Mol. Biol. 243, 639-652; Hong, S. S. & Boulanger, P. (1995) EMBO J. 14, 4714-4727, No. 19) oder antigenbindenden Einzelketten-Fv(scFv)-Fragmenten (Vaughan, T. J. et al. (1996) Nature Biotechnology 14, 309-314) verwendet und zum Targeting von Zellen (Barry, M. A. et al. (1996) Nature Medicine 2, 299-305, No. 3) vorgeschlagen.

Neben peptidpräsentierenden Phagenbanken sind peptidpräsentierende Bakterienbanken bekannt. Ein Beispiel hierzu sind Fusionen einer kombinatorischen Peptidbank mit Thioredoxin, was zur Identifizierung von Peptidaptameren führte, die die Cyclin-abhängige Kinase 2 erkennen (Colas, P. et al. (1996) Nature, 380, 548-550). Das Durchsuchen einer kombinatorischen Peptidbank wurde z. B. auch mit Fusionen an den C-Terminus der alpha-Untereinheit von G_i (340-350) zur Identifizierung von Rhodopsin-bindenden Sequenzen (Martin, E. L. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 361-366, No. 1) durchgeführt. Ein anderes Beispiel sind Peptidinsertionen in einem Thioredoxin-Flagellin-Fusionsprotein, welches auf der E. coli Zelloberfläche präsentiert wird, womit Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden können (Lu, Z. et al. (1995) Bio/Technology 13, 366-372; U.S. Pat. No. 5,635,182).

Die oben beschriebenen Anwendungen der peptidpräsentierenden Banken beschränkten sich jedoch auf in vitro Untersuchungen mit isolierten und gereinigten Komponenten (Zucker, Proteine, Antikörper).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Mittel zu finden, das eine gezielte und möglichst schonende Behandlung und Diagnose von erkrankten Organen ermöglicht.

- 5 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein gewebebindendes Peptid ausgewählt aus einem Peptid mit der Aminosäuresequenz

GEGRTVVLSF, AWCRRGILGDAM, GNLVDLVVGFDD, RVSPPKKSGGGV,
GSSKWGLTXKCG, RGGVRQSRGR, GEGRTVVCRS oder SQRWTALWQWIG

- 10 sowie Varianten davon.

Unter Varianten versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Deletionen, Additionen oder Substitutionen von einer oder mehreren Aminosäuren, wobei die gewebespezifische Bindung des Peptids im wesentlichen nicht verändert wird, d. h.
15 das Peptid hat nach wie vor seine Fähigkeit behalten, an ein bestimmtes Gewebe besser zu binden als an ein anderes.

Im Falle einer Deletion werden vorzugsweise nicht mehr als 4 Aminosäuren, vor allem nicht mehr als 2 Aminosäuren deletiert. Die Deletion erfolgt vorzugsweise am
20 N- oder am C-Terminus des Peptids, insbesondere am N-Terminus.

Unter dem Begriff Addition versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung nicht nur die Addition von einer oder mehreren Aminosäuren, beispielsweise von 1-25 Aminosäuren, sondern auch Fusionsproteine von dem erfindungsgemäßen Peptid
25 mit einem anderen C- und/oder N-terminalen Peptid oder Protein. Beispielsweise führt eine Fusion eines gewebespezifischen Peptids mit einem Peptid, das mehrere Histidine enthält, beispielsweise das Peptid GLFHAIAHFIHGGWHGLIHGWYG nicht nur zur einer gewebespezifischen Bindung, sondern auch zu einer Permeabilisierung der Zellmembran bei leicht saurem pH (siehe z. B. Midoux, P. et al. (1998)
30 Bioconjugate Chem. 9, 260-267). Besteht ein Fusionsprotein beispielsweise aus dem erfindungsgemäßen Peptid und mehreren Lysinen, beispielsweise 16 Lysinen in Abfolge oder dem Nucleocapsidprotein (NCp) 7 von HIV-1 oder NCp7-abgeleitete

- Peptide, so kann an das erfindungsgemäße Peptid besonders einfach eine Nukleinsäure, beispielsweise eine DNA enthaltend ein therapeutisches Gen, komplexiert werden (siehe z. B. Harbottle, R. P. et al. (1998) Human Gene Therapy 9, 1037-1047 oder Bachmann, A. S. et al. (1998) J. Mol. Med. 76, 126-132). Gemäß der vorliegenden Erfindung kann somit beispielsweise auch ein Fusionsprotein hergestellt werden, das ein gewebespezifisches Peptid, ein die Permeabilisierung der Zellmembran bewirkendes Peptid und ein Nukleinsäurebindendes Peptid enthält, was besonders vorteilhaft ist.
- 10 Im Falle von Substitutionen werden vorzugsweise konservative Substitutionen verstanden, d. h. Substitutionen, bei denen beispielsweise eine oder mehrere Aminosäuren mit einer hydrophoben Seitenkette durch eine oder mehrere andere Aminosäure mit einer anderen hydrophoben Seitenkette ausgetauscht werden. Beispiele von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten sind Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan oder Prolin. Ebenso können Aminosäuren mit einem polaren neutralen Rest untereinander ausgetauscht werden. Beispiele hierzu sind Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin oder Glutamin. Ferner können Aminosäuren mit einem polaren sauren Rest untereinander ausgetauscht werden. Beispielsweise fallen hierunter Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Auch können Aminosäuren mit einem polaren basischen Rest untereinander ausgetauscht werden, wie z. B. Lysin, Arginin oder Histidin. Vorzugsweise werden nicht mehr als bis zu 4 Aminosäuren, insbesondere nicht mehr als bis zu 2 Aminosäuren, vor allem nicht mehr als eine Aminosäure substituiert.
- 25 Unter dem Begriff Aminosäure versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung nicht nur die in Proteinen natürlich vorkommenden Aminosäuren, sondern auch andere in eine Peptidkette einbaubaren Aminosäuren, wie z. B. Hydroxylysin, Hydroxyprolin, Ornithin, Citrullin oder Homocystein.
- 30 Die einzelnen Aminosäuren des erfindungsgemäßen Peptids können auch modifiziert sein. Beispielsweise kann durch eine Modifizierung das Peptid markiert und/oder

geschützt werden. Eine geeignete Markierung ist beispielsweise der Austausch der Hydroxylgruppe von Threonin oder Serin mit dem Isotop ^{18}F , das eine Halbwertszeit von 2 Stunden besitzt, und daher gut im Klinikbetrieb verwendet werden kann. Alternativ kann das Peptid auch am Carboxyterminus über eine Fluorethylamidbindung mit ^{18}F markiert werden. Die C-terminale Fluoramidierung erfolgt beispielsweise mit Fluorethylamin und einem Harnstoffderivat (z. B. TBU) zur Aktivierung.

Eine andere geeignete Markierung ist die Markierung von Cystein oder Methionin mit dem Schwefelisotop ^{35}S . Das Isotop ^{35}S hat gegenüber dem Isotop ^{18}F den Vorteil, daß es eine längere Halbwertszeit besitzt.

Das erfindungsgemäße Peptid kann auch mit anderen Verbindungen markiert werden, beispielsweise mit β -Galaktosidase oder Biotin bzw. Avidin/Streptavidin. Eine radioaktive Markierung mit insbesondere kurzlebigen Isotopen hat jedoch den Vorteil, daß die Struktur des Peptids im wesentlichen unverändert bleibt und die Verteilung des Peptids im Organismus beispielsweise mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) auf vorteilhafte Weise analysiert werden kann.

Für eine Markierung ist es im allgemeinen vorteilhaft, wenn die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren vorher geschützt werden. Beispielsweise wird hierzu das Peptid an der Festphase mit Hilfe eines säurelabilen Harzes (z. B. SASRIN, ein 2-Methoxy-4-alkoxybenzylalkoholharz, Fréchet, J.M.J. et al. (1979) Polymer 20, 675) vom C- zum N-Terminus mittels der FastMoc®-Methode (Merrifield, R.B. (1963) J. Am. Chem. Soc. 95, 1328; Wang, S.S. (1973) J. Am. Chem. Soc. 95, 1328; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) synthetisiert. Auf diese Weise kann das Peptid vom Harz unter Bedingungen abgespalten werden, bei denen sowohl die Seitenkettenschutzgruppen als auch die N-terminale Schutzgruppe (Fmoc, N-Fluorenylmethoxycarbonyl) stabil bleiben. Anschließend kann die Markierung beispielsweise mit ^{18}F erfolgen. Danach erfolgt im allgemeinen die Abspaltung der Schutzgruppen und die Reinigung über HPLC.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure kodierend für ein erfindungsgemäßes gewebebindendes Peptid. Besonders bevorzugt ist eine Nukleinsäure ausgewählt aus einer Nukleinsäure mit der Nukleotidsequenz

5 GGCGAGGGGGCGAACAGTCGTATTGTCGTTTCG,
GCCTGGTGTCTGGGGGGGTATCCTGGGCGACGCTATG,
GGAAACCTGGTGGATCTAGTTGTGGGTTTTGACGAC,
CGGGTGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGTG,
GGGAGTAGCAAGTGGGGATTGACTTAAAAATGTGGG,
10 CGCGGGGGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGT,
GGCGAGGGGGCGAACAGTCGTATGTCGTTTCG oder
TCCCAGAGGTGGACTGCACTCTGGCAATGGATCGGG
sowie Varianten davon.

15 Unter dem Begriff Varianten versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung insbesondere Varianten, die aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes für dasselbe Peptid kodieren. Unter dem Begriff Varianten versteht man jedoch auch die zu den aufgeführten Desoxyribonukleinsäuren (DNA) korrespondierenden Ribonukleinsäuren (RNA). Auch kann die DNA bzw. RNA modifiziert sein, um z.
20 B. besser gegenüber Nukleasenabbau geschützt zu sein. Geeignete Modifikationen finden sich z. B. bei Uhlmann, E. & Peyman A. (1990) Chemical Reviews 90, 543-584 No. 4.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor
25 enthaltend eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren. Ein Vektor kann beispielsweise ein Expressionsvektor zur Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in E. coli z. B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryotische Expressionsvektoren für
30 die Expression in Saccharomyces cerevisiae z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1, für die Expression in Insektenzellen z. B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren,

welche alle allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674-2682), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839) oder den frühen SV40 Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. (1981) Nature 214, 228-232).

10

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, oder Adenoassoziierte Virusvektoren, z. B. ein Adenoassoziiierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

15

Beispielsweise wird in adenoviralen Vektoren, insbesondere vom Typ 5 (Sequenz siehe Chroboczek, J. et al. (1992) Virol. 186, 280 - 285) und vor allem von der Untergruppe C, im allgemeinen die E1-Genregion durch ein Fremdgen mit eigenem Promotor bzw. durch die erfindungsgemäße Nukleinsäure ersetzt. Durch den Austausch der E1-Genregion, welche für die Expression der nachgeschalteten adenoviralen Gene Voraussetzung ist, entsteht ein nicht replikationsfähiges Adenovirus. Diese Viren können sich dann nur in einer Zelllinie vermehren, welche die fehlenden E1-Gene ersetzt.

20

25

Replikationsdefiziente Adenoviren werden daher im allgemeinen durch homologe Rekombination in der sogenannten 293-Zelllinie (humane embryonale Nierenzelllinie), die eine Kopie der E1-Region stabil im Genom integriert hat, gebildet. Hierzu werden unter Kontrolle eines geeigneten Promotors die erfindungsgemäße Nukleinsäure in rekombinante adenovirale Plasmide kloniert. Anschließend erfolgt die homologe Rekombination mit einem E1-defizienten adenoviralen Genom, wie z.B. d1327 oder del1324 (Adenovirus 5), in der

30

Helferzelllinie 293. Bei erfolgreicher Rekombination werden virale Plaques geerntet. Die so erzeugten replikationsdefizienten Viren werden in hohen Titern (beispielsweise 10^9 bis 10^{11} "plaque forming units" oder plaquebildenden Einheiten) zur Infektion der Zellkultur oder für die somatische Gentherapie eingesetzt.

5

Im allgemeinen ist die genaue Insertionsstelle der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in das adenovirale Genom nicht kritisch. Es ist z.B. auch möglich, die erfindungsgemäße Nukleinsäure an die Stelle des deletierten E3-Gens zu klonieren (Karlsson, S. et al. EMBO J. 5, 1986, 2377 - 2385). Vorzugsweise wird jedoch die
10 E1-Region oder Teile davon, z.B. die E1A- oder E1B-Region (siehe z.B. WO 95/00655) durch die erfindungsgemäße Nukleinsäure ersetzt, vor allem, wenn auch die E3-Region deletiert ist. Desweiteren eignen sich adenovirale Vektoren der dritten Generation, d. h. Vektoren, die außer dem ITR und dem Verpackungssignal keine weiteren für virale Proteine kodierenden Sequenzen enthalten (Kochanek, S.
15 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5731). Die Rekombination in der Helferzelllinie erfolgt z. B. mit Hilfe eines Helferplasmids.

Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf das adenovirale Vektorsystem beschränkt, sondern auch Adeno-assoziierte Virusvektoren eignen sich in
20 Kombination mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in besonderer Weise, da der Transfer der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in ruhende, differenzierte Zellen durch AAV erfolgen kann, was für die Behandlung von Gefäßerkrankungen besonders vorteilhaft ist. Für die Vektorfunktionen genügen im allgemeinen die beiden ca. 145 bp langen invertierten terminalen
25 Wiederholungssequenzen (ITR: inverted terminal repeats; siehe z.B. WO 95/23867). Sie tragen die in "cis" notwendigen Signale für Replikation, Verpackung und Integration in das Wirtszellgenom. Durch die Integrationsfähigkeit kann eine lang anhaltende Genexpression in vivo gewährleistet werden, was wiederum besonders vorteilhaft ist. Ein weiterer Vorteil von AAV ist, daß das
30 Virus nicht pathogen für den Menschen und relativ stabil in vivo ist. Die Klonierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in den AAV-Vektor oder Teilen davon erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, wie sie z.B. in der WO

95/23867, bei Chiorini, J.A. et al. (1995), *Human Gene Therapy* 6, 1531 - 1541 oder Kotin, R.M. (1994), *Human Gene Therapy* 5, 793 - 801 beschrieben sind.

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man
5 die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen (neutral oder kationisch) komplexiert, d.h. die Nukleinsäure ist im wesentlichen in das Liposom eingeschlossen, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Herzmuskelzellen, erreicht werden kann (siehe z. B. WO95/27070) und die Nukleinsäure im wesentlichen vor DNasen geschützt ist. Besonders vorteilhaft ist
10 die Transfektion mit Nukleinsäure-Liposomen-Komplexen mit Hilfe von Sendai Viren in Form sogenannter HVJ-Liposomen (Virosomen), da hierdurch die Transfektionsrate noch weiter gesteigert werden kann.

Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden
15 durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die Nukleinsäure wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Nukleinsäure zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (Felgner, P. L. et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 7413-
20 7414) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr, J.P. et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6982 - 6986; Felgner, J.H. et al. (1994) *J. Biol. Chem.*
25 269, 2550 - 2561; Gao, X. & Huang, L. (1991), *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 195 - 203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethysulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioctadecylamidoglycylspermin). Ein Beispiel für die Herstellung von DNA-Liposomenkomplexen aus Phosphatidylcholin,
30 Phosphatidylserin und Cholesterin und deren erfolgreiche Anwendung in der Transfektion von Gefäßwänden mit Hilfe von Sendai-Viren ist in der WO95/27070 beschrieben.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn der Nukleinsäure-Liposomenkomplex Nukleinsäure-Bindeproteine, beispielsweise chromosomale Proteine, vorzugsweise HMG-Proteine (High Mobility Group Proteine), insbesondere HMG-1 oder HMG-2, oder nukleosomale Histone wie H2A, H2B, H3 oder H4 enthält, da hierdurch die Expression der gewünschten Nukleinsäure mindestens 3-10fach gesteigert werden kann. Die chromosomalen Proteine können beispielsweise aus Kalbsthymus oder Rattenleber nach allgemein bekannten Verfahren isoliert oder gentechnisch hergestellt werden. Humanes HMG-1 kann beispielsweise nach dem Fachmann bekannten Methoden besonders einfach gentechnisch unter Verwendung der humanen cDNA-Sequenz aus Wen, L. et al. (1989) Nucleic Acids Res., 17(3), 1197-1214, hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Peptids, bei dem das Peptid entweder chemisch synthetisiert oder, wie oben bereits erläutert, gentechnisch hergestellt wird. Die chemische Synthese erfolgt beispielsweise mit Hilfe der allgemein bekannten Merrifield-Technik.

Gewebebindende Peptide können jedoch auch gemäß der vorliegenden Erfindung dadurch gewonnen werden, daß ein oder mehrere Peptide mit einem Gewebe in Kontakt gebracht und anschließend das bzw. die gebundenen Peptide isoliert werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zum Auffinden eines gewebebindenden Peptids enthaltend folgende Schritte:

- (a) In-Kontakt-bringen eines Gewebes mit einem oder mehreren Peptiden, und
- (b) Isolieren eines oder mehrerer gewebebindender Peptide.

30

Vorzugsweise werden nach dem In-Kontakt-bringen eines Gewebes mit einem oder mehreren Peptiden gemäß Schritt (a) nicht-gebundene Peptide beispielsweise durch

Waschen des Gewebes mit einer geeigneten Pufferlösung entfernt.

Unter Peptid versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung vorzugsweise Peptide mit einer Länge von ca. 5 bis ca. 40 Aminosäuren, insbesondere mit einer Länge
5 von ca. 5 bis ca. 20 Aminosäuren, vor allem mit einer Länge von ca. 10 bis ca. 20, besonders bevorzugt mit einer Länge von ca. 10 bis ca. 15 Aminosäuren.

Unter Gewebe versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Zellverbände, insbesondere Zellverbände einschließlich ihrer Interzellulärsubstanz, beispielsweise
10 Epithelgewebe, Bindegewebe, Stützgewebe, Muskelgewebe oder Nervengewebe. Der Begriff Gewebe schließt gemäß der vorliegenden Erfindung auch ganze Organe oder Teile davon sowie Gefäße ein. Vorzugsweise handelt es sich bei den Organen bzw. Gefäßen noch um „lebende“ Organe bzw. Gefäße.

15 Die Interzellulärsubstanz ist eine in die Zwischenzellräume eingelagerte Substanz, die eine strukturlos erscheinende Grundsubstanz und faserige Bindegewebsfasern enthält. Es war daher völlig überraschend, daß durch In-Kontakt-bringen von Gewebe mit einem oder mehreren Peptiden gewebebindende Peptide aufgefunden wurden, die im wesentlichen für das verwendete Gewebe spezifisch waren und nicht
20 vorwiegend an unspezifische Strukturen, wie z. B. die Interzellulärsubstanz, gebunden wurden.

Die Spezifität der gewebebindenden Peptide läßt sich vorzugsweise dadurch erhöhen, daß die gemäß Schritt (b) isolierten Peptide wiederholt ein oder mehrmals
25 mit dem Gewebe in Kontakt gebracht werden. Vorzugsweise werden die Peptide nach ihrer jeweiligen Isolierung bis zu 10mal mit dem entsprechenden Gewebe in Kontakt gebracht. Auf diese Weise können auch kreuzspezifische Peptide, die für mehrere Gewebearten spezifisch sind, gefunden werden, wenn die Peptide nacheinander mit verschiedenen Geweben in Kontakt gebracht werden. Werden
30 beispielsweise die Peptide portionsweise sowohl mit gesundem als auch mit krankem Gewebe in Kontakt gebracht, so können durch einen subtraktiven Vergleich die Peptide aufgefunden werden, die für gesundes bzw. krankes Gewebe

spezifisch sind. Peptide, die im wesentlichen nur für krankes Gewebe spezifisch sind, eignen sich beispielsweise besonders vorteilhaft für die Diagnose, beispielsweise im Rahmen einer PET-Untersuchung.

- 5 Es ist auch bekannt, daß durch äußere Umstände, wie z. B. Stress oder Entzündungen, Gewebe pathologisch verändert werden können. So verändern z.B. glatte Muskelzellen in restenotischen Gefäßarealen ihren gesamten Phänotyp und gehen vom ruhenden, sekretorischen in den proliferativen Phänotyp über. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung können folglich auch gewebebindende Peptide
10 gefunden werden, die unter in vivo Bedingungen spezifisch pathologisch verändertes Gewebe erkennen können. Auch ist es auf vorteilhafte Weise möglich, pathologische Zelltypen im Gewebeverband, die bisher noch nicht ausreichend charakterisiert werden konnten, spezifisch durch Verwendung der gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren selektierten Peptiden zu
15 charakterisieren, zu identifizieren und beispielsweise gentherapeutisch zu therapieren.

Zum Auffinden gewebebindender Peptide gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es vorteilhaft, wenn eine Peptidbank, beispielsweise eine
20 kombinatorische Peptidbank (siehe z. B. Colas, P. et al. (1996) supra), verwendet wird. Unter Peptidbank gemäß der vorliegenden Erfindung versteht man eine Ansammlung von mehreren verschiedenen Peptiden, die frei oder in gebundener Form vorhanden sind.

- 25 Eine Peptidbank aus freien Peptiden enthält beispielsweise eine Ansammlung von chemisch synthetisierten Peptiden. (siehe z. B. Geysen, H. M. et al. (1996) supra). Bei der Peptidsynthese wurden an der Festphase Aminosäuregemische verwendet, so daß die Aminosäurenabfolge der sich ergebenden Peptide statistisch verteilt war. Die Peptidbanken konnten hierbei auch in Harz-gebundener Form verwendet
30 werden (de Koster, H. S. et al. (1995) supra).

Peptide in gebundener Form sind beispielsweise auch sogenannte

peptidpräsentierende Banken, z. B. eine peptidpräsentierende Phagenbank oder vorzugsweise eine peptidpräsentierende Bakterienbank, wie oben bereits näher beschrieben. Bei den peptidpräsentierenden Banken werden die Peptide in Form eines Fusionsproteins an der Oberfläche von beispielsweise Phagen oder Bakterien präsentiert. Bevorzugte Fusionen sind Insertionen, vorzugsweise Fusionen mit Thioredoxin, mit Thioredoxin(TrxA)-Flagellin(FliC), mit der alpha-Untereinheit von G_i, wie oben bereits näher beschrieben, oder z. B. mit LamB (Charbit, A. et al. (1988) Gene 70, 181-189) oder Lpp-OmpA (Francisco, J. A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10444-10448).

Für die vorliegende Erfindung sind peptidpräsentierende Bakterienbanken und insbesondere solche mit einem Thioredoxin-Fusionsprotein vor allem für eine Selektion in einem in vivo angenäherten Perfusionsmodell von isolierten Gefäßen und Organen aus folgenden Gründen besonders bevorzugt:

1. Die Peptide werden als Fusionsproteine zusammen mit einem Protein, beispielsweise Thioredoxin, präsentiert, dessen dreidimensionale Struktur im allgemeinen bekannt ist. Die randomisierten Peptide werden im allgemeinen in einer sehr gut zugänglichen, auf der Oberfläche des Gesamtproteins nach außen liegenden Domäne, beispielsweise der sogenannten „Cys-Cys active site loop“ des Thioredoxins, präsentiert. Dadurch daß das Peptid im allgemeinen genügend weit vom Bakterium und somit gut zugänglich präsentiert wird, wird im allgemeinen eine gute Interaktion mit dem gewünschten Bindungspartner ermöglicht.

Folglich kann im allgemeinen gewährleistet werden, daß beispielsweise beim viralen Gentransfer in vaskuläre Zellen die Peptide auch in Form von Fusionsproteinen mit einem therapeutisch wirkenden Protein ihre Wirkung entfalten können, ohne daß sie ihre Bindungsfähigkeit im wesentlichen verlieren. Peptide die an den Terminus eines Proteins fusioniert und auf diese Weise in Phagenbanken präsentiert werden, verlieren im allgemeinen ihre Bindungsfähigkeit sobald sie als Fusionsproteine zusammen mit einem therapeutisch wirkenden Protein exprimiert werden, was für die Verwendung in

der Gentherapie nachteilig ist. Ein wesentlicher Grund hierfür ist, daß die Peptide während der Präsentation selbst einen freien N-oder C-Terminus aufweisen, der für eine Bindung zur Verfügung steht. Aus diesem Grund ist es besonders vorteilhaft, wenn die Peptide in Form von Insertionen in ausgewählte Oberflächenproteine von einer peptidpräsentierenden Bank präsentiert werden.

2. Beispielsweise ist das E.coli Thioredoxin stabil gegen Proteasen. Folglich ist ein proteaseresistentes Protein in Form eines Fusionsproteins mit dem Peptid beispielsweise für eine Selektion im ex-vivo perfundierten Organmodell besonders bevorzugt, insbesondere da Proteasen sich in den Gefäßen an den Zellen befinden können. Vor allem Organe, z.B. isolierte perfundierte Leber, aber auch Tumore, setzen eine hohes Maß an Proteasen frei, die das Fusionsprotein im Falle einer Proteaseempfindlichkeit spalten könnten.

3. Bakterien können aufgrund ihrer Größe nicht so schnell wie Phagen in den extravasalen Raum gelangen und damit beispielsweise im perfundierten Organ an Zellen gelangen, die für eine spätere Therapie nicht zugänglich sind. Im Gegensatz zu Phagen können entsprechende Bakterienbanken auch bei Körpertemperatur inkubiert werden, ohne daß die Ergebnisse durch Endozytose im wesentlichen verfälscht werden. Hierdurch können die in vivo Bedingungen auch ex vivo im wesentlichen eingehalten werden, was beispielsweise bei „lebenden“ Organen bzw. Gefäßen besonders vorteilhaft ist.

Unter dem Begriff „lebend“ versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Organe bzw. Gefäße, die noch funktionsfähig sind. Für den Erhalt der Funktionsfähigkeit über einen längeren Zeitraum ist es daher vorteilhaft, wenn das Organ bzw. das Gefäß ausreichend mit Sauerstoff und Nährsubstraten versorgt werden. Hierzu eignet sich vorzugsweise eine Nährlösung, die Ca^{2+} , Mg^{2+} sowie ein Protein, beispielsweise ein Albumin wie BSA (bovines Serumalbumin) enthält. Vorzugsweise sind die Konzentration an Calciumionen 2,5 mM und an Magnesiumionen 1,1 mM. Albumin ist vorzugsweise in einer Konzentration von 1% in der Nährlösung vorhanden. Zur Perfusion von isolierten

Gefäßen und isolierten Organen eignet sich besonders die sogenannte Krebs-Henseleit-Lösung, die wie folgt zusammengesetzt ist (Angaben in mM): NaCl 116; KCl 4,6; MgSO₄ 1,1; NaHCO₃ 24,9; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; Glukose 8,3; Pyruvat 2,0 sowie 1% BSA äquilibriert mit 95% O₂ und 6% CO₂ (pH 7,4; 37 °) (siehe z. B. Decking, U. K. M. et al. (1997) Circulation Research 81, 154-164, No. 2)

In einer bevorzugten Ausführungsform wurde beispielsweise eine peptidpräsentierende Bakterienbank in einem in-vitro Gefäßperusionsmodell eingesetzt, nachdem zuvor in-vivo am Gesamttier (Ratte) an einem Gefäß eine Restenose durch Denudierung des Endothels mittels eines Ballonkatheters induziert worden war. Dieses Verfahren hat die entscheidenden Vorteile, daß die als Folge pathologischer Gefäßprozesse auftretenden Veränderungen der Expressionsmuster von membranassoziierten bzw. membrangebundenen Proteinen erhalten bleiben, die Zellpolarität sich nicht verändert und alle Zellen in ihrem natürlichen Gewebeverband verbleiben.

Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens aufgefundenen Peptide können, wie oben bereits näher beschrieben, modifiziert werden. Eine geeignete Modifikation ist beispielsweise eine radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung für die Verwendung in einem Testsystem bzw. Diagnostikum.

Für die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren auffindbaren gewebespezifischen Peptide gibt es zahlreiche Anwendungen, beispielsweise den gewebespezifischen Transfer von Substanzen, insbesondere von pharmazeutisch aktiven Verbindungen, vor allem für den gewebespezifischen Gentransfer. Der gewebespezifische Gentransfer dient beispielsweise zur Diagnose und/oder Therapie von Gefäß- und/oder Organerkrankungen mit Hilfe beispielsweise viraler und/oder nicht-viraler Vektoren, vorzugsweise mit Hilfe von Liposomen, wie oben bereits näher beschrieben.

Für den gewebespezifischen Gentransfer kann das Peptid physikalisch, chemisch

oder gentechnisch an die gewünschte Nukleinsäure gekoppelt werden (s. o.). Beispielsweise kann das Peptid entweder zusammen mit einem therapeutischen Protein, z. B. Stickstoffmonoxid-Synthase (siehe z. B. WO95/27020), Insulin (siehe z. B. EP-B1-0 001 929), Erythropoietin (siehe z. B. EP-B1-0 148 605), oder
5 Blutgerinnungsfaktoren, wie z. B. Faktor VIII, Interferone, Cytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren usw. exprimiert werden, oder an eine Nukleinsäure, welche ein therapeutisches Gen, beispielsweise ein Gen kodierend für die beispielhaft genannten therapeutischen Proteine oder für eine antisense-Nukleinsäure zum gezielten Ausschalten von Expressionsprodukten, gekoppelt werden. Geeignete
10 Kopplungsmethoden sind z. B. über Lysinreste oder Nucleocapsidproteine, wie oben bereits näher erläutert (siehe z. B. Harbottle, R. P. et al. (1998) supra oder Bachmann, A. S. et al. (1998) supra). Besonders vorteilhaft ist es, wenn ein oder mehrere gewebebindende Peptide über eine positiv geladene Domäne, z. B. Polylysin, an eine oder mehrere Nukleinsäuren gebunden sind.

15

Zur Erhöhung der Membranpermeation beim Gentransfer eignet sich auch ein Peptid, das die Membranpermeation erhöht, z. B. ein Hisitidin-enhaltendes Polypeptid (s.o.). Vorzugsweise wird eine sogenannte Polyfektionslösung enthaltend eine Nukleinsäure mit dem gewünschten therapeutischen Gen, ein Fusionsprotein
20 aus gewebespezifischem Peptid und einem DNA-bindenden Anteil, z. B. eine positiv geladenen Domäne, und einem Peptid, das die Membranpermeation erhöht, eingesetzt. Eine geeignete Polyfektionslösung ist beispielsweise bei Midoux, P. (1998) supra, beschrieben. Desweiteren ist eine Kopplung des Peptids an die Liposomen über ein beispielsweise eingebrachtes C-terminales Cystein an eine
25 aktivierte Lipidkomponente, z. B. über MPB-PE, Maleinimidophenylbutyroylphosphatidylethanolamin, (Zuidam, N.J. et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1240, 101).

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch zur Änderung des Tropismus von
30 Viren, vorzugsweise von Adenoviren, beispielsweise für den gewebespezifischen Gentransfer, eingesetzt werden. Dies erfolgt beispielsweise durch Anheften des Peptids über einen geeigneten Linker an den C-Terminus der Knob-Domäne

(siehe z. B. Douglas, J. T. & Curiel, D. T. (1997) Neuromuscular Disorders 7, 284-298) oder durch den Austausch der für die Bindung verantwortlichen Region in der Knob-Domäne des Fiberproteins. Alternativ kann auch das RGD-Motiv in der hypervariablen Region der Penton-Base (z.B. Ad12 19AS, Ad2.5 82 AS) durch ein zellspezifische Peptid ersetzt werden analog zu den von Wickham durchgeführten Versuchen mit dem FLAG-Epitop, wobei vorzugsweise ebenfalls der natürliche Tropismus ausgeschaltet werden kann (siehe Wickham et al. (1996) J. Virol. 70, 6831). Die Änderung des Tropismus kann beispielsweise über ein Shuttleplasmid erfolgen, das für das entsprechende Konstrukt kodiert.

Eine andere Verwendungsmöglichkeit der gewebebindenden Peptide ist die Verwendung zur Diagnose von krankhaft verändertem Gewebe, vor allem in einem pathologisch veränderten Gefäß, bei Entzündungen, Arteriosklerose, Gefäßen, die Tumorgewebe versorgen, und Gewebe mit proliferierenden glatten Muskelzellen des Gefäßsystems, sowie die Darstellung verschiedener Abschnitte des Gefäßsystems, wie z. B. kleine/große Gefäße, Venen, organspezifisches Endothel.

Die Diagnose kann hierbei entweder indirekt über z. B. Peptid-erkennende Antikörper beispielsweise in einem allgemein bekannten ELISA-Test erfolgen (siehe z. B. Voller, A. et al. (1976) Bull. World Health Organ., 53, 55-63) oder direkt, indem das gewebebindende Peptid zusätzlich markiert ist. Die Markierung kann hierbei eine nicht-radioaktive Markierung, z. B. über Biotin bzw. Avidin/Streptavidin, sein oder auch eine radioaktive Markierung (s. o.).

Eine radioaktive Markierung ist insbesondere bei einer Ganzkörperuntersuchung des Patienten mit bildgebenden Verfahren, wie z. B. PET (positron emission tomography) oder SPECT (single photon emission computer tomography) zur Diagnose von beispielsweise Entzündungen, Gefäßveränderungen oder Tumoren, vorteilhaft. Hierzu wird dem Patienten das markierte Peptid intravenös appliziert und die Verteilung des Peptids im Organismus beispielsweise mittels „Ganzkörper-PET“ analysiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Arzneimittel und/oder Testsystem beispielsweise in Form eines Diagnostikums enthaltend ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide bzw. ein oder mehrere Peptide, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgefunden wurden, oder ein oder mehrere
5 erfindungsgemäße Nukleinsäuren, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf eine Zusammensetzung beispielsweise in Form eines Transfektions- oder
10 Polyfektionssystems enthaltend ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide bzw. ein oder mehrere Peptide, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgefunden wurden, oder ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren und eine weitere Substanz, vorzugsweise eine pharmazeutisch aktive Verbindung, wie oben bereits
15 näher beschrieben, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

Als Hilfs- und/oder Zusatzstoffe eignen sich beispielsweise allgemein bekannte Protease- bzw. Nukleaseinhibitoren.

20 Die folgenden Figuren, Tabellen und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken:

FIGUREN UND TABELLEN

25 Fig.1 zeigt das Carotismodell von Clowes. Nach Ligaturen der A. Carotis interna und externa wird ein Ballonkatheter über die A. Carotis externa in die A.carotis communis eingeführt, dilatiert und das Gefäß über eine Strecke von 1 - 1,5 cm denudiert. Anschließend wird der Katheter wieder entfernt, die A. Carotis externa ligiert und die A. Carotis interna wiedereröffnet.

30

Fig. 2 zeigt die Selektion der Peptide in der ex-vivo perfundierten Rattencarotis.

Fig. 3 zeigt die relative Bindungsstärke des Peptids P36 an eine dilatierte Rattencarotis, die am 8. postoperativen Tag entnommen wurde, im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Carotis.

- 5 Fig. 4 zeigt die Bindungskonstanten des Peptids P36 an primäre, aortale Schweine-endothelzellen (PAEC), primäre Schweine glatte Muskelzellen (VSMC) und Affennierenzellen (COS). Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte durch LPS und $\text{TNF}\alpha$ (PAEC stimuliert).
- 10 Tab. 1 zeigt die DNA-Sequenzen und davon abgeleitete Peptidsequenzen der isolierten Klone.

15 ABKÜRZUNGEN

	BSA	bovines Serumalbumin
	DCM	Dichlormethan, synonym: Methylenchlorid
	DIEA	Diisoethylamin
20	EDT	Ethandithiol
	HBTU/HOBt	Hydroxybenzotriazol
	IMC	Medium, enthält (1xM9 Salze, 0,2 % (Casaminosäuren, 0,5 % Glucose, 1 mM MgCl_2) 10xM9 Salze: 0,42 M Na_2HPO_4 , 0,22 M KH_2PO_4 , 85 mM NaCl, 187 mM NH_4Cl , pH7,4)
25	NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
	PBS	Phosphatpuffer
	SASRIN	„super acid sensitive resin“
	TFA	Trifluoressigsäure

30 BEISPIELE

1. Herstellen einer peptidpräsentierenden Bakterienbank

Es wurde eine peptidpräsentierende Bakterienbank verwendet, die über die Firma
35 Invitrogen BV, Niederlande kommerziell erhältlich ist (FliTrx™ Random Peptide Display Library, Katalog No. K1125-01; Z. Lu, et al. (1995) Biotech. 13, 366).

Bei dieser Bakterienbank enthalten die Bakterien eine Expressionskassette, die für ein Fusionsprotein aus Flagellin und Thioredoxin codiert. Das Flagellin dient zur Verankerung des Fusionsproteins in der Bakterienmembran, während das Thioredoxin in einer exponierten Domäne ein fremdes 12 Aminosäuren langes Peptid präsentiert, dessen codierendes 36 Basenpaar langes Oligonukleotid an der entsprechenden Stelle in die codierende Sequenz des Thioredoxins kloniert wurde. Das zur Klonierung verwendete Oligonukleotid wurde nach dem Zufallsprinzip synthetisiert, so daß die Bakterienbank insgesamt 10^9 verschiedene Peptide repräsentiert. Die Expressionskassette befindet sich unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoters, so daß die Expression des Fusionsproteins zum Zeitpunkt einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur durch die Gabe von Tryptophan angeschaltet werden kann. Da jedes Bakterium nur ein Plasmid aufnimmt, wird von jedem Bakterium nur eine Sorte Peptid mit definierter Aminosäure-Sequenz exprimiert und auf der Oberfläche präsentiert.

15

2. Anzüchten der Bakterienkultur

50 ml IMC Medium wurden mit 10^9 Bakterien versetzt und über Nacht 15 Stunden bei $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl durch Messung der OD_{600} bestimmt, 10^{10} Zellen in 50 ml IMC Medium mit $100\mu\text{g/ml}$ Ampicillin inkubiert und die Expression der Bakterienbank durch Zugabe von $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Tryptophan induziert. Die Zellen wurden weitere 6 Stunden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bevor sie zur Selektionierung verwendet wurden.

25

3. In vitro Gefäßperforationsmodell

Die Induktion einer Restenose erfolgte in einem etablierten Restenosemodell in der Ratte (siehe z. B. Clowes, A. W. et al. (1983) Lab. Invest. 49, 327).

30

Wie in Fig. 1 dargestellt, wurde beispielsweise in einer narkotisierten Ratte die Arteria carotis communis durch Einführung eines Ballonkatheters von den Endothelzellen befreit (Denudation). Durch diesen Eingriff werden die glatten Gefäßmuskelzellen zur Proliferation angeregt und ändern ihren Phänotyp vom ruhenden, sekretorischen glatten Muskelzelle zur proliferierenden glatten Muskelzelle.

Am Tage der stärksten Proliferation der glatten Muskelzellen (10. postoperativer Tag) wurde das in Fig. 1 gekennzeichnete Gefäßsegment herauspräpariert und in einem speziellen ex-vivo Perfusionssystem mit einem salinen Medium unter Zusatz von Glucose und Sauerstoffbegasung perfundiert. Nach einer Äquilibrationszeit von 10 min, die zum Auswaschen jeglicher Blutzellen und Blutbestandteile diente, wurde dieses Gefäßsegment mit insgesamt 10^{10} peptidpräsentierenden Bakterien in sauerstoffbegastem salinen Medium mit einem Flow von 0,2 ml/min. 60 min rezirkulierend perfundiert. Die nicht bindenden Bakterien wurden durch Behandlung mit salinem Medium abgelöst und die spezifisch bindenden Bakterien durch zehnminütige Perfusion unter stringenten Bedingungen mit 0,1 M Glycin pH 2,0 eluiert. Die eluierten Bakterien wurden erneut kultiviert und zur Erhöhung der Spezifität weiteren fünf Selektionszyklen (siehe Fig. 2) unterworfen.

4. Versuchsprotokoll für die perfundierten Ratten-Carotis

Ca 500g schwere Ratten wurden durch Gabe von $100\mu\text{l}/100\text{ g}$ Körpergewicht Dormicum und $100\mu\text{l}/100\text{g}$ Körpergewicht Hypnorm narkotisiert. Anschließend wurde die Arteria Carotis kranial der Bifurkation freipräpariert, die A. Carotis interna sowie alle davon abzweigenden Abgänge ligiert und ausgehend von der Carotis externa ca 2 cm entlang der Carotis Communis mit einem 2F Ballonkatheter bei 1 bar die Carotis Communis denudiert. Die Ligatur der A. Carotis interna wurde postoperativ wieder eröffnet. Am 10. postoperativen Tag wurde die denudierte A. Carotis communis freipräpariert und ex vivo mit 0,1

ml/min PBS mit 0,1 M Glucose perfundiert. Währenddessen wurden 10 ml der mit Tryptophan induzierten Bakteriensuspension bei 1000 rpm 3 min abzentrifugiert, in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das Sediment in 6 ml Gesamtvolumen PBS, 0,1 M Glucose, 0,1% BSA, 1 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 suspendiert. Die Carotis wurde anschließend rezirkulierend mit dieser Suspension unter Sauerstoffbegasung 1 h mit 0,2 ml/min perfundiert. Anschließend wurde die Suspension durch Perfusion mit 2-3 ml PBS bei 0,2 ml/min ausgewaschen, bevor die gebundenen Bakterien durch Elution mit 3 ml 0,1 M HCl (pH 2,2 mit Glycin eingestellt) eluiert und in 50 ml IMC Medium, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin über Nacht bei +25 °C vermehrt wurden.

5. Ergebnis der Selektionsversuche

Gemäß den oben beschriebenen Versuchen wurden Bakterien erhalten, die auf ihrer Oberfläche Peptide exprimieren, die spezifisch an proliferierende glatte Muskelzellen binden. Die nach sechs Selektionen erhaltenen Bakterien wurden anschließend auf Nährmedium ausplattiert und ausgehend von 60 Einzelkolonien wurden Kulturen angezüchtet. Von diesen kultivierten Bakterien, wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Mit diesem Modell konnten überraschenderweise spezifisch bindenden Peptide mit einer der in vivo Situation am nächsten stehende Methode (Organkulturmodell) detektiert werden.

Nach Sequenzierung der DNA der isolierten Bakterien wurden die DNA-Sequenzen und davon abgeleitete Peptidsequenzen erhalten (siehe Tabelle 1). Das Peptid 36 zeigt in seiner Sequenz Homologien zum α_4 -Integrin, das auf Leukocyten exprimiert wird und für die Anheftung der Leukocyten an aktiviert vaskuläre Zellen verantwortlich ist. Die Erkennung wird dabei durch das vaskuläre zelluläre Adäsionsmolekül VCAM-1 mediiert. Die Homologie liegt nicht in dem Bereich, der als bindender Bereich des Integrins (RGD-Motif) charakterisiert ist.

6. Bindungsstudien

Das für die Bindungsstudien eingesetzte Peptid aus Klon 36 (Peptid 36) wurden mit der Fast-Moc Festphasensynthese an einem vollautomatischen Peptidsynthesizer der
5 Firma Applied Biosystems im 0.1 mmol Maßstab hergestellt. Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten an den gewünschten Zelltyp wurde das Peptid radioaktiv markiert.

10 7. Radioaktive Markierung eines gewebespezifischen Peptids

Da die zur Selektion eingesetzten Bakterien die Peptide auf ihrer Oberfläche im Kontext eines Fusionsproteins (Thioredoxin) präsentierten, wurde die N-terminal auftretende Aminosäure (Glycin) für die radioaktive Markierung verwendet. Dazu
15 wurde ^{14}C -Glycin mit aktiviertem N-Fluorenyl-Methoxycarbonyl-Succinimid geschützt, gereinigt und an das am Harz befindliche, in den Seitenketten geschützte Peptid mittels Dicyclohexyl-carbodiimid kovalent N-terminal gekoppelt. Anschließend wurde das Peptid vom Harz abgespalten, mittels HPLC gereinigt und im perfundierten Gefäßmodell sowie in der Zellkultur auf Bindung an die Zielzellen
20 hin untersucht.

8. Versuchsprotokoll zur Synthese des radioaktiv markierten ^{14}C -Fmoc-Glycins

25 20 μmol des sich in 5 ml Wasser befindenden, radioaktiv markierten ^{14}C -Glycins (entsprechend 1 mCi; DuPont) wurden zusammen mit 38 mg Glycin (0,5 mmol) und 53 mg Na_2CO_3 (0,5 mmol) in einem 25 ml Rundkolben vorgelegt und tropfenweise unter Rühren mit 165 mg (0,49 mmol) in 5 ml Aceton gelöstem N-
30 Fluorenylmethoxycarbonyl-Carbonat (Fmoc-Carbonat) versetzt. Während des Zutropfens (60 min) wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1 M Na_2CO_3 konstant gehalten. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, die wäßrige Phase durch Zugabe von 2 M HCl angesäuert und zweimal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen

wurden mehrmals mit Wasser neutral gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und das Produkt durch Zugabe von Petrolether gefällt und abfiltriert. Zur Reinigung wurde das Produkt in Ethylacetat gelöst und durch Zugabe kleiner Mengen Petrolether langsam ausgefällt.

5

Ausbeute: 95 mg (entsprechend 68 % der Theorie)
0,32 mmol
spezifische Aktivität: 0,0064 MBq/ μmol

10

9. Versuchsprotokoll zur Synthese radioaktiv markierter Peptide

Das markierte Fmoc-Glycin wurde für die Synthese von insgesamt 0,4 mmol Peptid eingesetzt, so daß jedes Peptid zu 75% markiert wurde.

Die entsprechende Menge des Harz/Peptid-Gemischs (0,1 mmol) wurde eingewogen und in eine Glasfritte mit Schliffstopfen und Hahn gegeben. 25 mg des ^{14}C -Fmoc-Glycins (0,075 mmol) wurden in 1 ml NMP gelöst, mit 155 μl 0,45M HBTU/HOBt und 750 μl 2 M DIEA in NMP versetzt, zum Harz/Peptid-Gemisch gegeben und eine Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zur Vervollständigung der Kopplung 150 mg Fmoc-Glycin (0,5 mmol) in 2 ml NMP gelöst, mit 2 ml 0,45M HBTU/HOBt und 1 ml 2M DIEA versetzt und zum Reaktionsgemisch zugegeben. Das Gemisch wurde 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert, das nicht reagierte Fmoc-Glycin abfiltriert und das Gemisch viermal mit je 6-10 ml NMP gewaschen. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte durch 30minütige Inkubation mit 22% Piperidin in NMP unter Rühren. Das Piperidin wurde abfiltriert, und das Harz/Peptid-Gemisch anschließend je viermal mit NMP und DCM gewaschen.

30

10. Versuchsprotokoll zur Abspaltung der Schutzgruppen

Zur Abspaltung der Schutzgruppen wurde das Gemisch eisgekühlt und mit einer Lösung aus 0,75 g Phenol, 0,25 ml EDT, 0,5 ml Thioanisol, 0,5 ml Wasser und

10 ml TFA unter Rühren versetzt. Anschließend wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert, das frei gewordene Peptid abfiltriert und durch Zugabe des fünffachen Volumens eisgekühltem Diethylether gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das im Sediment befindliche Peptid mehrmals mit
5 Diethylether gewaschen und erneut zentrifugiert.

Die Peptide wurden chromatographisch mittels eines Äkta-Purifiers 100 über eine RPC-Resource-Säule (3 ml, Pharmacia) mit einem 20minütigem Gradienten von Wasser, 0,1 % TFA bis 95 % Acetonitril, 0,07 % TFA bei einer
10 Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeuten: 65,6 und 70,8 % (je nach Peptid)
spezifische Aktivität: 0,0165 bis 0,0182 MBq/ μ mol

15

11. Bindungsstudien

Für die Bindungsstudien im perfundierten Gefäßmodell sowie in der Zellkultur auf Bindung an die Zielzellen wurden die Gefäße bzw. die Zellen für
20 verschiedene Zeitintervalle mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu untersuchenden Peptide inkubiert und die Menge an gebundenen Peptid pro cm Gefäß bzw. pro Zellzahl bestimmt.

25

11.1 Bindung an die perfundierte Carotis

Aus Fig. 3 ist zu entnehmen, daß das Peptid 36 in der ex-vivo Perfusion annähernd vierfach stärker an die dilatierte Carotis bindet, als an die unbehandelte Kontrolle.

30 11.2 Bindung an Endothelzellen des Schweins in Zellkultur

Da das Peptid 36 auch Homologien zur porcinen α_4 -Intergrinsequenz aufweist,

wurden desweiteren Zellkulturuntersuchungen an porcinen Endothelzellen durchgeführt (PAEC), die durch Behandlung mit Lipopolysacchariden (LPS) und dem Tumor-Nekrose Faktor (TNF α) stimuliert wurden. Diese Stimulation entspricht einer in-vivo Aktivierung von Zellen, die bei Streß oder
5 inflammatorischen Reizen ausgesetzten Gefäßarealen und damit auch in restenotischen Gefäßarealen lokalisiert sind.

Das Peptide konnte dabei sowohl spezifisch an glatte Muskelzellen (VSMCs) als auch an aktivierte PAECs binden. Überraschenderweise bindet das Peptid sogar
10 stärker an aktivierte PAECs als an VSMCs. Darüberhinaus unterscheiden sich die Bindungskonstanten des Peptids gegenüber aktivierten und nicht-aktivierten PAECs um fast 3 Zehnerpotenzen (Fig. 4). An Kontrollzellen (COS) bindet das Peptid praktisch nicht.

Patentansprüche

1. Gewebefesthaltendes Peptid ausgewählt aus einem Peptid mit der Aminosäuresequenz
5 GEGRTVVLSF, AWCRGGILGDAM, GNLVDLVVGFDD,
RVSPPKKSGGGV, GSSKWGLTXKCG, RGGVRQSRGRR,
GEGRTVVCRS oder SQRWTALWQWIG sowie Varianten davon.
2. Nukleinsäure kodierend für ein gewebefesthaltendes Peptid gemäß Anspruch 1.
10
3. Nukleinsäure nach Anspruch 2 ausgewählt aus einer Nukleinsäure mit der Nukleotidsequenz
15 GGCGAGGGGCGAACAGTCGTATTGTCGTTTCG,
GCCTGGTGTCTGGGGGGGTATCCTGGGCGACGCTATG,
GGAAACCTGGTGGATCTAGTTGTGGGTTTTGACGAC,
CGGGTGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGTG,
GGGAGTAGCAAGTGGGGATTGACTTAAAAATGTGGG,
CGCGGGGGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGT,
20 GGCGAGGGGCGAACAGTCGTATGTCGTTTCG oder
TCCCAGAGGTGGACTGCACTCTGGCAATGGATCGGG
sowie Varianten davon.
4. Vektor enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 2 oder 3.
25
5. Verfahren zur Herstellung eines gewebefesthaltenden Peptids gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid entweder chemisch synthetisiert oder gentechnisch hergestellt wird.
- 30 6. Verfahren zum Auffinden eines gewebefesthaltenden Peptids enthaltend folgende Schritte:
(a) In-Kontakt-bringen eines Gewebes mit einem oder mehreren Peptiden, und

- (b) Isolieren eines oder mehrerer gewebebindender Peptide.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß Schritt (b) isolierten Peptide wiederholt ein oder mehrmals mit demselben
5 oder mit einem anderen Gewebe in Kontakt gebracht werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe ein krankhaftes Gewebe ist.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6-8, dadurch gekennzeichnet, daß das oder die Peptide in einer Peptidbank enthalten sind.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptidbank eine peptidpräsentierende Bank, vorzugsweise eine peptidpräsentierende
15 Bakterienbank ist.
11. Verwendung eines gewebebindenden Peptids gemäß Anspruch 1 oder erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10 für den gewebespezifischen Transfer von Substanzen, insbesondere von
20 pharmazeutisch aktiven Verbindungen, vor allem für den gewebespezifischen Gentransfer.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Gentransfer viral und/oder nicht-viral, vorzugsweise mit Hilfe von
25 Liposomen abläuft.
13. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere gewebebindende Peptide über eine positiv geladene Domäne an eine oder mehrere Nukleinsäuren gebunden sind.
30
14. Verwendung eines gewebebindenden Peptids gemäß Anspruch 1 oder erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10 zur

Änderung des Tropismus von Viren, insbesondere von Adenoviren.

15. Verwendung eines gewebebindenden Peptids gemäß Anspruch 1 oder erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10 zur
5 Diagnose von krankhaft verändertem Gewebe und/oder zur Darstellung verschiedener Abschnitte des Gefäßsystems, vorzugsweise kleine/große Gefäße, Venen oder organspezifisches Endothel.
16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das
10 krankhaft veränderte Gewebe ausgewählt ist aus einem pathologisch veränderten Gefäß; bei Entzündungen; Arteriosklerose; Gefäßen, die Tumorgewebe versorgen; Gewebe mit proliferierenden glatten Muskelzellen des Gefäßsystems.
17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß das
15 gewebebindende Peptid markiert, vorzugsweise radioaktiv markiert ist.
18. Arzneimittel und/oder Diagnostikum enthaltend ein oder mehrere
20 gewebebindende Peptide gemäß Anspruch 1, eine oder mehrere Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 2-4 oder ein oder mehrere gewebebindende Peptide erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
19. Zusammensetzung enthaltend ein oder mehrere gewebebindende Peptide
25 gemäß Anspruch 1, ein oder mehrere Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 2-4 oder ein oder mehrere gewebebindende Peptide erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6-10, und eine weitere Substanz, vorzugsweise eine pharmazeutisch aktive Verbindung, und
30 gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

Fig. 1a

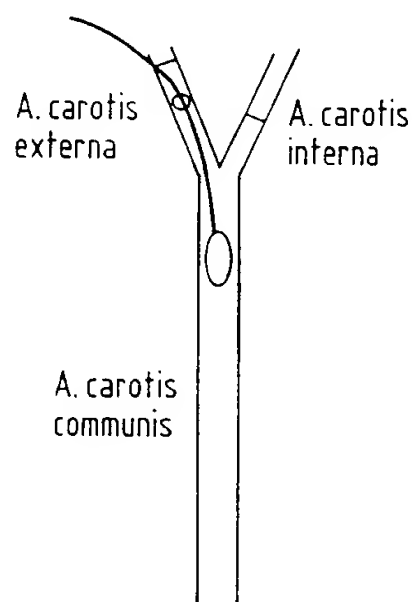
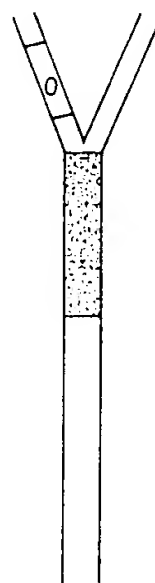
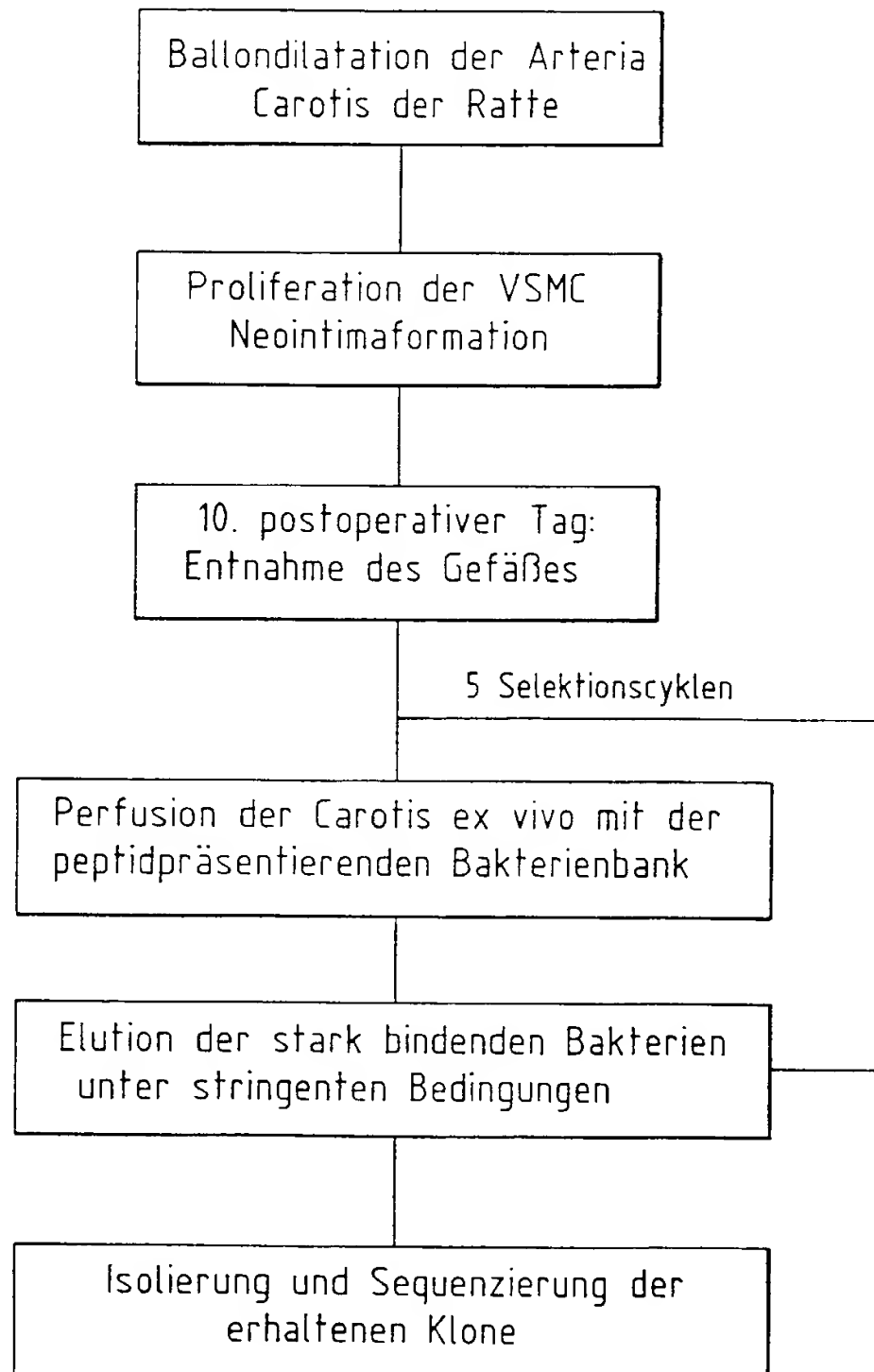


Fig. 1b



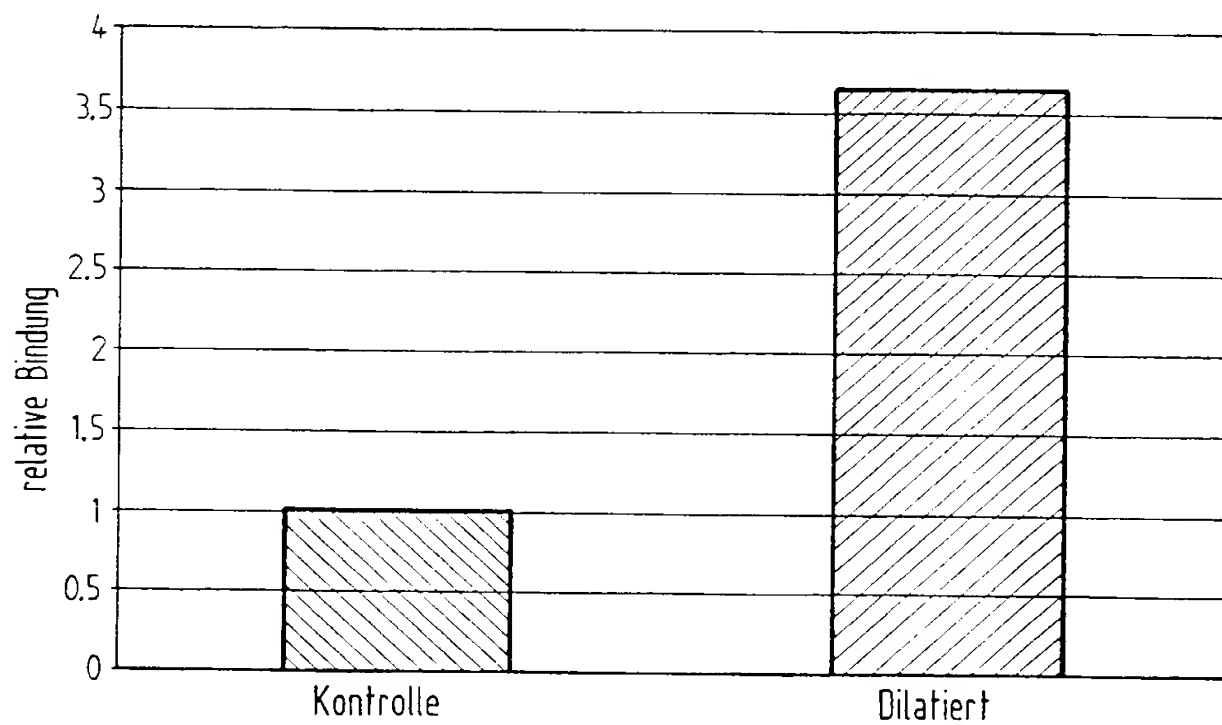
2 / 5

Fig. 2



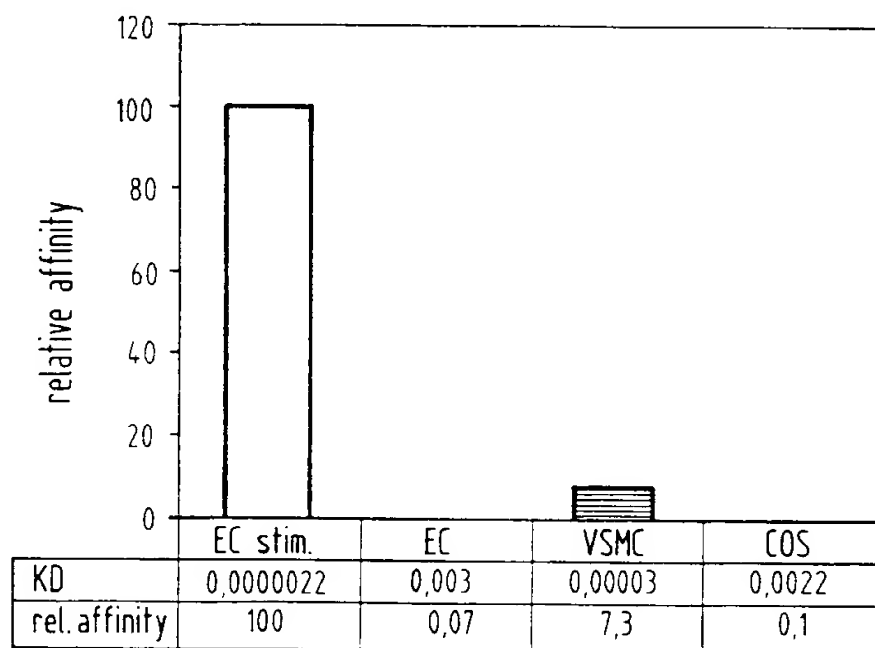
3 / 5

Fig. 3



4 / 5

Fig. 4



Tab. 1

Klon	DNA-Sequenz	AS-Sequenz
3	GGCGAGGGGCGAACAGTCGTATTGTCGTTTCG	GEGRTVVLSF
4, 13	GCCTGGTGTCTGGGGGGGTATCCTGGGCGACGCTATG	AWCRGGILGDAM
7, 23	GGAAACCTGGTGGATCTAGTTGTGGGTTTTGACGAC	GNLVDLVVGFDD
9	CGGGTGAGTCCGCCAAAGAAGTCGGGGGGCGGCGTG	RVSPPKKSGGGV
17, 20, 21, 22, 29, 30	GGGAGTAGCAAGTGGGGATTGACTTAAAAATGTGGG	GSSKWGLTXKCG
19	CGCGGGGGAGTCCGCCAAAGAACTCGGGGGCGGCGT	RGGVRQRSRGR
32	GGCGAGGGGCGAACAGTCGTATGTCGTTTCG	GEGRTVVCRS
36	TCCCAGAGGTGGACTGCACTCTGGCAATGGATCGGG	SQRWTALWQWIG

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Prof. Dr. Jürgen Schrader

 <120> Gewebefesthaltende Peptide, ihre Identifizierung, Herstellung und
 Verwendung

10 <150> 19845434.1

 <151> 1998-10-02

 <160> 17

15 <170> FastSEQ for Windows Version 3.0

 <210> 1

 <211> 10

 <212> PRT

20 <213> künstliche Sequenz

 <220>

 <223> Tissue binding peptide

25 <400> 1

 Gly Glu Gly Arg Thr Val Val Leu Ser Phe 10

30 <210> 2

 <211> 12

 <212> PRT

 <213> künstliche Sequenz

35 <220>

 <223> Tissue binding peptide

40 <400> 2

 Ala Trp Cys Arg Gly Gly Ile Leu Gly Asp Ala Met 12

45 <210> 3

 <211> 12

 <212> PRT

 <213> künstliche Sequenz

 <220>

 <223>

<400> 3

Gly Asn Leu Val Asp Leu Val Val Gly Phe Asp Asp 12

5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

10

<220>

<223> Tissue binding peptide

<400> 4

15

Arg Val Ser Pro Pro Lys Lys Ser Gly Gly Gly Val 12

<210> 5

<211> 12

20

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Tissue binding peptide

25

<400> 5

Gly Ser Ser Lys Trp Gly Leu Thr Xaa Lys Cys Gly 12

30

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Tissue binding peptide

<400> 6

40

Arg Gly Gly Val Arg Gln Arg Ser Arg Gly Arg Arg 12

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

45

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Tissue binding peptide

5 <400> 7

Gly Glu Gly Arg Thr Val Val Cys Arg Ser 10

<210> 8

10 <211> 12

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

15 <223> Tissue binding peptide

<400> 8

20 Ser Gln Arg Trp Thr Ala Leu Trp Gln Trp Ile Gly 12

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

25

<220>

<223> Tissue binding peptide

<400> 9

30

Gly Leu Phe His Ala Ile Ala His Phe Ile His Gly 12

Gly Trp His Gly Leu Ile His Gly Trp Tyr Gly 23



5 <210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

10 <220> Sequence coding for tissue binding peptide
 <223>

 <400> 10

 ggcgagggggc gaacagtcgt attgtcgttc g 31

15 <210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

20 <220>
 <223> Sequence coding for tissue binding peptide

 <400> 11

25 gcctggtgtc ggggggggtat cctggggcgac gctatg 36

30 <210> 12
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

35 <220>
 <223> Sequence coding for tissue binding peptide

 <400> 12

 ggaaacctgg tggatctagt tgtgggtttt gacgac 36

5 <210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Sequence coding for tissue binding peptide
10 <400> 13

 cggggtgagtc cgccaaagaa gtcgggggggc ggcgtg 36

15 <210> 14
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

20 <220>
 <223> Sequence coding for tissue binding peptide

 <400> 14

25 gggagtagca agtgggggatt gacttaaaaa tgtggg 36

 <210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
30 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Sequence coding for tissue binding peptide

35 <400> 15

 cgcggggggag tccgccaaag aagtcggggg cggcgt 36



.

.

.

.

6

	<210> 16	
	<211> 30	
5	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Sequence coding for tissue binding peptide	
10	<400> 16	
	ggcgcagggggc gaacagtcgt atgtcggttcg	30
15	<210> 17	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
20	<220>	
	<223> Sequence coding for tissue binding peptide	
	<400> 17	
25	tcccagaggt ggactgcact ctggcaatgg atcggg	36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 99/07296

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

Based on the results of the preliminary examination, no additional fees are to be reimbursed according to PCT Rule 40.2(e).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-19 (Inventions 1, 7, 8)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

ADDITIONAL MATTER

PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions as follows:

1. Claims: (1-5, 11-19) partially

Tissue binding peptide having amino acid sequence GEGRTVVCRS. Corresponding nucleotide sequence, applications and compositions.

2. Claims: (1-5, 11-19) partially

Tissue binding peptide having amino acid sequence AWCRRGGILGDAM. Corresponding nucleotide sequence, applications and compositions.

3. Claims: (1-5, 11-19) partially

Tissue binding peptide having amino acid sequence GNLVDLVVGFDD. Corresponding nucleotide sequence, applications and compositions.

4. Claims: (1-5, 11-19) partially

Tissue binding peptide having amino acid sequence RVSPPKKSGGGV. Corresponding nucleotide sequence, applications and compositions.

5. Claims: (1-5, 11-19) partially

Tissue binding peptide having amino acid sequence GSSKWGLTXKCG. Corresponding nucleotide sequence, applications and compositions.

6. Claims: (1-5, 11-19) partially

Tissue binding peptide having amino acid sequence RGGVRQSRGRR. Corresponding nucleotide sequence, applications and compositions.

7. Claims: (1-5, 11-19) partially

Tissue binding peptide having amino acid sequence SQRWTALWQWIG. Corresponding nucleotide sequence, applications and compositions.

8. Claims: (6-10) COMPLETELY

Method for finding a tissue binding peptide containing the following steps: contacting a tissue with one or more peptides and isolating one or more tissue binding peptides.

ADDITIONAL MATTER

PCT/ISA/210

Continuation of Box I.1

Although claims 15-17 (insofar as an in vivo method is claimed) relate to a diagnostic method that is conducted on the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition provided that the above can be searched.

Continuation of Box I.2

Patent claims 11-19 relate partially to peptides characterized by a desirable feature namely that they are obtained according to the method in accordance with one of claims 6-10. The patent claims comprise therefore all peptides having said feature, whereas the patent application provides supports in the description as defined by PCT Article 5 for only a limited number of said products. In the present case, the patent claims lack the necessary support and the patent application lacks the necessary disclosure to such an extent that a meaningful search covering the entire range of protection sought for appears to be impossible. Nevertheless, the patent claims also lack the clarity required by PCT Article 6 in which it is sought to define a connection with respect to the desired result. Furthermore, the lack of said clarity is such that a meaningful search covering the entire range of protection sought for appears to be impossible. For this reason, the search was directed towards those parts of the patent claims that appeared to be clear, supported or disclosed as previously defined, namely those parts referring to the peptides defined in table 1 and claim 1.

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07296

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9735022	A	25-09-1997	AU 714389 B	23-12-1999
			AU 5109796 A	10-10-1997
			EP 0886678 A	30-12-1998
			NZ 304017 A	29-07-1999
WO 9840508	A	17-09-1998	AU 6462998 A	29-09-1998
			EP 0973926 A	26-01-2000